

بررسی جهش ها در اگزون های ۲۳-۱۹ ژن MYH7 در بیماران کاردیومیوپاتی هایپرتروفی به روش PCR-SSCP/HA در استان چهارمحال و بختیاری

ثریا حیدری^۱، دکتر ارسلان خالیدی فر^{۲*}، دکتر راضیه پوراحمد^۱، دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتی^۳، سمیه

حیدری^۲، نادر باقری^۲، سمیه رئیسی^۴، مرضیه ابوالحسنی^۳

^۱گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲گروه قلب، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۳مرکز تحقیقات سلولی و

مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۴گروه سلولی و مولکولی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۲۷ اصلاح نهایی: ۹۲/۳/۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۱۱

چکیده:

زمینه و هدف: کاردیومیوپاتی هایپرتروفی (HCM) رایج ترین نوع از بیماری های قلبی است که ۰/۲ درصد از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار داده و همچنین رایج ترین علت مرگ قلبی ناگهانی در جوانان زیر ۳۵ سال است. حدود ۳۵ درصد موارد بیماری مربوط به اگزون های ۲۴-۸ از ژن MYH7 است. هدف این مطالعه بررسی احتمال حضور جهش های مربوط به ژن MYH7 در اگزون های ۲۳-۱۹ در بیماران HCM استان چهارمحال و بختیاری بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۳۰ بیمار مبتلا به HCM به روش نمونه گیری آسان از بین مراجعین به کلینیک قلب دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انتخاب شدند. در این بیماران DNA به روش استاندارد فنل-کلروفرم استخراج شد. اگزون های مورد نظر با استفاده از روش PCR تکثیر و با روش SSCP به صورت تک رشته تبدیل شد و همراه نمونه های دو رشته ای روی ژل پلی آکریل آمید الکتروفورز گردید. سپس باندهای مشکوک تعیین توالی گردید و نتایج با استفاده از نرم افزار Chromas تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: در اگزون های ۲۰، ۲۱ و ۲۳ تغییری مشاهده نشد، اما در اگزون های ۱۹ و ۲۲ دو جهش R719W و R870H یافت شد که به ترتیب در دو و یک نفر از بیماران وجود داشتند.

نتیجه گیری: از آنجا که تغییرات در اگزون های ۱۹ و ۲۲ باعث تغییر اسید آمینه ای در میوزین بتا می شود، جهش های ژن MYH7 در این اگزون ها، احتمالاً سهم به سزایی در بیماران HCM این استان دارند. به هر صورت، لازم است برای نتیجه گیری بهتر، بیماران بیشتری مورد مطالعه قرار گیرند.

واژه های کلیدی: کاردیومیوپاتی هایپرتروفی، ژن MYH7، جهش، SSCP/HA.

مقدمه:

دیگر علائم این بیماری، انسداد مجرای خروجی بطن چپ و فیروز (Fibrosis) می باشد که یا اصلاً دیده نمی شود یا شدید است (۲). بیماری دارای ناهمگنی فنوتیپی بالایی می باشد و خصوصیات بالینی آن از هایپرتروفی شدید با مرگ ناگهانی تا شکل خوش خیم که در افراد هتروزیگوت دیده می شود، متغیر است. آریتمی (Arrhythmia) و مرگ ناگهانی در غیاب علائم

رایج ترین نوع ارثی تک ژنی از بیماری های قلبی، کاردیومیوپاتی هایپرتروفی (Hypertrophic Cardiomyopathy) است که ویژگی های آن، ضخیم شدن دیواره بطن چپ که منجر به کاهش فضای بطن چپ می شود، بی نظمی سارکومری، به هم ریختگی میوفیبریل ها (Myofibril)، اختلال دیاستول (Diastole)، ایسکمی (Ischemia) میوکارد، ضربان نامنظم قلب و مرگ ناگهانی است (۱). از

مربوط به ژن MYH7 می باشد (۲). ژن MYH7 که ژنی بزرگ حدود ۲۵ کیلو باز است و ۴۰ اگزون دارد، کد کننده زنجیره سنگین میوزین بتا می باشد و عمدتاً در بطن ها بیان می شود (۴). فیلامان های (Filament) ضخیم حاوی پروتئین زنجیره سنگین میوزین β هستند که با ۴ مولکول زنجیره سبک میوزین مرتبط می باشند. زنجیره سنگین میوزین بتا ۳۰ درصد میوزین قلبی و ۹۵ درصد میوزین بطنی را تشکیل می دهد و از ۱۹۳۴ اسید آمینه تشکیل شده است (۱۳). تقریباً ۱۹۴ جهش و ۱۵ چند شکلی در این ژن گزارش شده است (۱۴). توالی یابی کامل این ژن در بیماران HCM نشان داده که اغلب جهش ها در اگزون های ۲۴-۸ آن واقع شده اند که سرکروی و اتصال سر و دم را کد می کنند. هدف از این مطالعه بررسی اگزون های ۲۳-۱۹ می باشد که قبلاً جهش هایی در آنها گزارش شده است به طوری که تا به حال نه جهش و یک چند شکلی در اگزون ۱۹، پانزده جهش در اگزون ۲۰، چهارده جهش در اگزون ۲۱، بیست و چهار جهش و یک چند شکلی در اگزون ۲۲ و هجده جهش و یک چند شکلی در اگزون ۲۳ گزارش شده است (۱۸-۱۴)، لذا با توجه به اینکه در ایران مطالعات اندکی در ارتباط با اساس مولکولی این بیماری صورت گرفته است. این مطالعه با هدف بررسی احتمال حضور جهش ها در اگزون های ۲۳-۱۹ ژن MYH7 در استان چهارمحال و بختیاری طراحی و اجرا شده است.

روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی که در فاصله زمانی دی ماه ۱۳۸۹ تا خرداد ماه ۱۳۹۱ صورت گرفت، از بین مراجعین سراسر استان به کلینیک قلب دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۳۰ بیمار مبتلا به کاردیومیوپاتی هایپرتروفی، بر اساس یافته های بالینی و اکوکاردیوگرافی (۱۹) و به روش نمونه گیری آسان جهت انجام مطالعه در نظر گرفته شدند. بعد از تهیه

اکوکاردیوگرافی، هایپرتروفی بطن چپ در بیمار دارای ژنوتیپ بیمارزا نشان دهنده نفوذ ناقص فنوتیپی است (۵-۳). فنوتیپ با سن فرد تغییر می کند. هایپرتروفی می تواند در ابتدای تولد با اشکال انسدادی و هایپرتروفی شدید، سیر سریع به سمت نارسایی قلبی و درصد بالای مرگ و میر مشخص گردد (۶). نوجوانان و بالغین جوان در حالت شدیدی از هایپرتروفی بطن چپ همراه با انسداد راه خروجی، کاهش فضای بطنی و پیشروی به سوی مرگ ناگهانی را نشان می دهند (۷، ۸). در تمام گروه های سنی، از بدو تولد تا دهه ۸۰، دیده شده که یک نفر از ۵۰۰ نفر از جمعیت کلی به آن مبتلا شده اند و شایع ترین علت مرگ ناگهانی در جوانان زیر ۳۵ سال بوده است (۹).

آنالیز ژنتیکی موجب تسهیل تشخیص بیماری در مراحل پیش کلینیکی شده و پیشرفت های زیادی در شناخت مبنای ژنتیکی بیماری حاصل آمده است. تشخیص بیماری با تعیین ژنوتیپ بیماران روز به روز بیشتر می شود و به خصوص که وجود روش های دارویی و مداخله ایی برای پیشگیری از مرگ ناگهانی افراد مستعد، اهمیت موضوع را بیشتر می کند. همچنین طبقه بندی خطرزایی بیماری بر مبنای معیارهای مولکولی انجام پذیر است. این بیماری به دو شکل اولیه و ثانویه است. شکل اولیه بیماری در اثر عواملی چون فشار خون، تنگی آئورت، تمرینات ورزشی و استفاده از بعضی داروها ایجاد می گردد (۱۰، ۱۱). نوع ثانویه آن اغلب فامیلی بوده و انتقال آن بر پایه توارث آتوزومی غالب است البته فقط ۵۰ درصد موارد جنبه فامیلی دارند (۱۲).

تحقیقات زیادی جهت تشخیص اساس ژنتیکی HCM انجام شده است که نتیجه آنها شناسایی بیش از ۹۰۰ جهش در بیش از ۲۰ ژن بوده که اغلب این ژن ها پروتئین های سارکومری را کد می کنند. از جمله مهمترین این ژن ها، ژن های MYH7، MYBPC3 و TNNT2 می باشند. حدود ۳۵ درصد موارد بیماری

پرسشنامه و کسب رضایتمانه کتبی از بیماران مبتلا به HCM، ۵ میلی لیتر خون جهت انجام آزمایشات مولکولی در لوله حاوی EDTA نیم مولار گرفته و به آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی ارسال و تا زمان انجام آزمایشات در شرایط ۲۰- درجه در فریزر نگهداری شد. سپس DNA خون بیماران به روش معمول فنل و کلروفرم (۲۰) استخراج گردید و غلظت DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری (unc1 2100 USA) اندازه گیری شد. در ادامه با استفاده از توالی ژن MYH7 با رمز دسترسی (NG_007884) و نرم افزار Primer3، توالی های آغازگر جلوپرنده، (Forward primer=F) و آغازگر معکوس، (Reverse primer=R) برای آگزون های ۱۹ تا ۲۳ این ژن طراحی و خریداری شد. با توجه به طول آگزون های ۲۲ و ۲۳، از آنجا که محصولات PCR با طول بیشتر از ۳۵۰bp برای روش PCR-SSCP/HA کارایی ندارند (۲۱)، این دو آگزون به دو قسمت تقسیم و برای هر یک دو جفت پرایمر طراحی شد (جدول شماره ۱). واکنش PCR برای هر آگزون بصورت اختصاصی و به منظور

افزایش قطعه مورد نظر، انجام شد.

هر میکروتیوپ PCR حاوی ۰/۲μl از هر یک از دو آغازگر F و R با غلظت ۱۰pM، ۰/۱ μl آنزیم Taq DNA Polymerase (۵unit/ μl)، ۰/۵μl مخلوط دزوکسی نوکلئوتیدهای تری فسفات با غلظت ۱۰mM، ۲/۵μl بافر PCR (۱۰X)، ۱/۵μl MgCl₂ (۵۰mM) و ۱μl DNA (۱۰۰ ngr) بود که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵μl رسید. تکثیر DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ASTEC PC818 ساخت کشور ژاپن انجام شد. شرایط دمایی بهینه شامل ۳۰ سیکل مشتمل بر: دمای واسرشته شدن ۹۶°C به مدت ۶ دقیقه، دمای اتصال (مطابق جدول شماره ۱ به تفکیک آگزون ها) به مدت ۱ دقیقه و دمای ساخت رشته های مکمل ۷۲°C به مدت ۵۰ ثانیه بود.

استفاده از تکنیک چند شکلی ساختار تک رشته ای، SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) بر این اساس استوار است که DNA تک رشته ای با توجه به ترکیب بازی می تواند حالت ها و آرایش های

جدول شماره ۱: توالی آغازگرهای طراحی شده، دمای اتصال پرایمرها و طول قطعات مربوط به هر آگزون در تکنیک PCR

اندازه قطعه (bp)	دمای اتصال	آغازگرها	آگزون
۲۲۰	۶۸°C	F: cagtgcacaaagccaggatca R: ctctggtgcaccctcatacc	۱۹
۲۰۶	۶۷°C	F: ctggacacttcctctcag R: gcatcagaggagtcacatggaa	۲۰
۲۲۱	۶۷°C	F: cctcgtacccctccctagtc R: ctcagagaagcgggaaacct	۲۱
۱۶۳	۶۷°C	F: aggctcagcactccttcaa R: ggaggccatctccttctc	۲۲A
۲۰۱	۶۵°C	F: gctgctgaagagtcagaaa R: ggggtggaagagccaacagta	۲۲B
۱۹۵	۵۶-۵۷°C	F: tgtcctctcctcctccta R: cattctcctcctcctcca	۲۳A
۲۰۴	۶۶°C	F: agattcagctggaggccaag R: aggagctgcccttacct	۲۳B

R= Reverse; F= Forward

فضایی متعددی بگیرد، بنابراین اگر در DNA نرمال جهشی رخ داده باشد منجر به تغییر آرایش فضایی تک رشته ای آن شده که بر اساس تفاوت حرکت آن روی ژل پلی اکریل آمید جدا می گردد. به منظور بررسی جهش های احتمالی با استفاده از روش PCR-SSCP شامل SSCP محصولات PCR و آنالیز هترو دوپلکس، (Hetero duplex Analysis=HA) به طور همزمان است، بعد از تکثیر قطعات مورد نظر توسط روش PCR، نمونه های مورد نظر بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد (Merk Germany)، با جریان ۵۰ mA به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شدند و سپس با نیترا ت نقره رنگ آمیزی و باندها رؤیت گردیدند (۲۲). در صورت صحت باندها محصول PCR مربوط به آنها جهت SSCP مورد استفاده

قرار گرفتند. برای این منظور، از هر نمونه ی محصول PCR، ۸µl برداشته و با ۶µl از SSCP Dye مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۶°C حرارت دادیم تا دو رشته DNA به طور کامل از هم جدا شوند. سپس نمونه ها بلافاصله روی یخ قرار گرفتند تا از تشکیل مجدد DNA دو رشته ای ممانعت شود. از طرفی ۲µl محصول PCR از هر نمونه با ۳µl EDTA (۰/۵ مولار)، مخلوط و در دستگاه ترموسایکلر به حرارت ۹۶°C رسانده شد، سپس ۵ دقیقه در این حرارت نگهداری و طی ۶۰ سیکل ۳۰ ثانیه ای حرارت به ۳۷°C رسانده شد (۲۳). محصولات PCR آماده شده برای SSCP هر نمونه را با محصولات PCR آماده شده برای هترو دوپلکس همان نمونه مخلوط و در ژل پلی اکریل آمید بارگیری شدند (جدول شماره ۲).

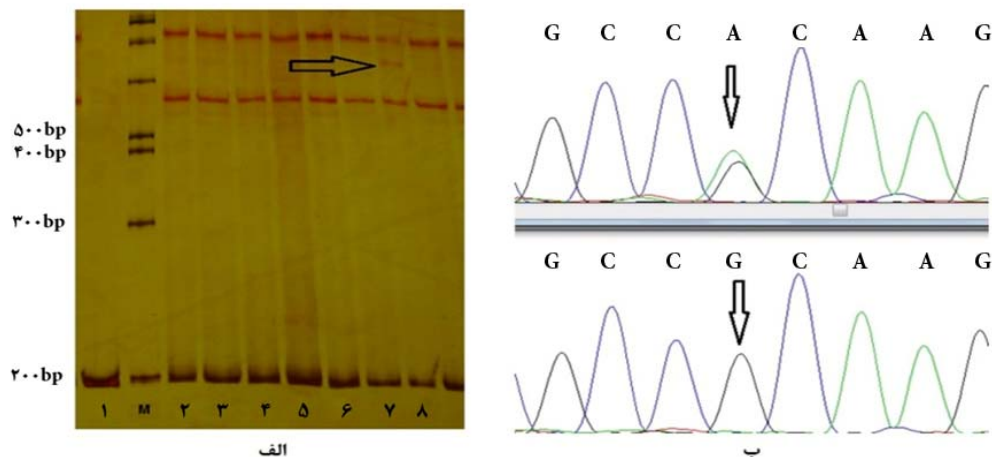
جدول شماره ۲: برنامه تنظیم شده الکتروفورز محصولات SSCP و HA اگزون های ۱۹-۲۳ ژن MYH7

اگزون	ولتاژ (ولت)	دما (°C)	زمان (ساعت)	غلظت ژل (۱:۳۹)
۱۹	۳۰۰	۱۲	۶/۵	۸٪
۲۱	۲۵۰	۱۰	۶/۲۵	۸٪
۲۰ و ۲۲A	۳۳۰	۲۰	۶	۸٪
۲۲B	۳۵۰	۱۲	۶	۱۰٪
۲۳A	۳۳۰	۱۰	۶	۸٪
۲۳B	۳۳۰	۱۲	۶	۸٪

یافته ها:

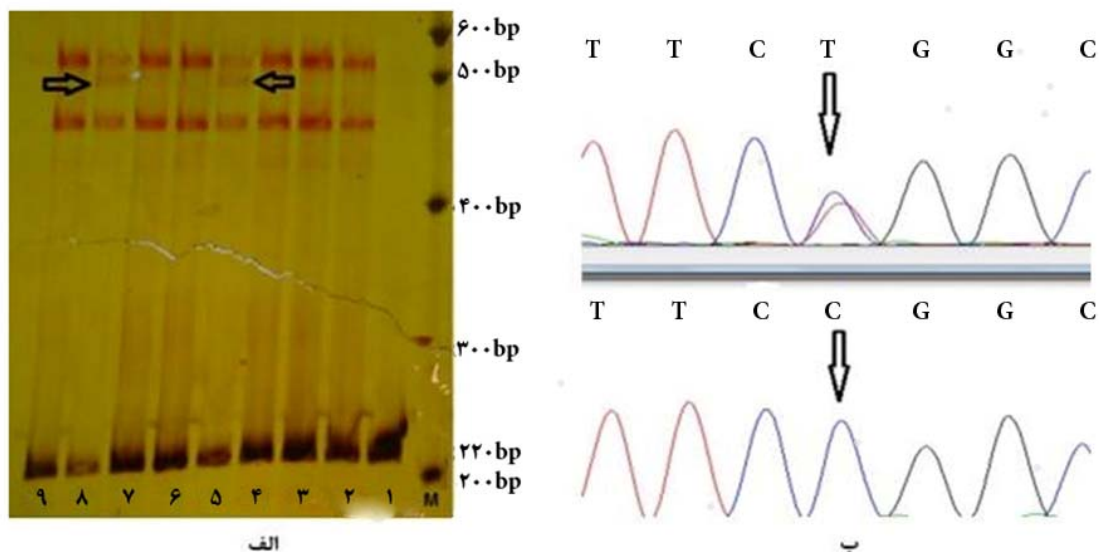
بعد از پایان الکتروفورز، ژل پلی اکریل آمید با نیترا ت نقره رنگ آمیزی و باندهای DNA بر روی آن رویت و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در نهایت کلیه ی نمونه های مشکوک به داشتن جهش MYH7 که دارای الگوی متفاوت بر روی ژل پلی اکریل آمید بودند، توسط روش تعیین توالی DNA مورد تأیید قرار گرفته و نتایج با استفاده از نرم افزار Chromas تجزیه و تحلیل شدند.

در این مطالعه ۳ مورد مشکوک با روش تعیین توالی مورد تأیید نهایی قرار گرفتند. تغییرات یافت شده شامل یک جهش بصورت C>T ۹۶۹۲ در اگزون ۱۹ در دو نفر از بیماران (مردی ۴۲ ساله و زنی ۴۳ ساله با سابقه فامیلی از بیماری) و یک جهش بصورت G>A ۱۰۸۲۴ در خانمی ۷۳ ساله بدون سابقه فامیلی از بیماری بود (تصاویر شماره ۱ و ۲).



تصویر شماره ۱: جهش G>A در ۱۰۸۲۴ در اگزون ۲B.

الف) ژل پلی آکریل آمید مربوطه. M: مارکر، ۱: کنترل واسرشته نشده، ۲: کنترل سالم، ۳ تا ۸: بیماران که الگوی بیمار شماره ۸ (علامت پیکان) با بقیه و با کنترل سالم متفاوت است و یک باند اضافه دارد. ب) کروماتوگرام مربوطه. شکل بالا مربوط به فرد بیمار و شکل پایین مربوط به فرد سالم است. علامت پیکان نشان دهنده نوکلئوتید جهش یافته می باشد.



تصویر شماره ۲: جهش C>T در ۹۶۹۲ در اگزون ۱۹.

الف) ژل پلی آکریل آمید مربوطه. M: مارکر، ۱: کنترل واسرشته نشده، ۲: کنترل سالم، ۳ تا ۹: بیماران که الگوی بیمار شماره ۵ و ۸ (علامت های پیکان) با بقیه و با کنترل سالم متفاوت است و یک باند اضافه دارد. ب) کروماتوگرام مربوطه. شکل بالا مربوط به فرد بیمار و شکل پایین مربوط به فرد سالم است؛ علامت پیکان نوکلئوتید جهش یافته را نشان می دهد.

بحث:

MYH7 می باشد (۲۴). مطالعات مختلف، جهش در ژن MYH7 را در حدود ۳۵-۳۰٪ موارد این بیماری نشان داده اند که اگزون های محدوده ۲۴-۸ بیشترین درگیری را در بیماری دارند. اما این رقم در بیماران

کاردیومیوپاتی هایپرتروفی در اکثر موارد بدلیل جهش در یکی از ژن های سارکومری ایجاد می شود. تاکنون حدود ۱۹۴ جهش در انسان شناخته شده که ۱۱۵ مورد از این جهش ها مربوط به ژن

ملاحظه شده مربوط به MYH7 بودند به طوری که در یکی از خانواده های مورد مطالعه، جهش G15319A اگزون ۲۳ ژن MYH7، در ۳ عضو خانواده نشان داده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که جهش G15319A در اگزون ۲۳ ژن MYH7، علت HCM فامیلی با فنوتیپ بدخیم بوده و در تمام موارد بیماران مبتلا باید از نظر مشکلات انسدادی عروق قلبی مورد بررسی قرار گیرند (۱۸).

Garcia و همکاران توالی اگزون های ۱۹، ۲۰، ۲۴-۲۲ و ۳۰ از ژن MYH7 را در ۳۰ بیمار با دامنه سنی ۶۰-۱۸ سال مبتلا به HCM در استرالیا بررسی نمودند که ۲۵ مورد آنان سابقه فامیلی داشتند. در این مطالعه در یک خانم بیمار مبتلا به HCM فامیلی شدید، جهش Met822Val در اگزون ۲۲ مشاهده شد که این جهش در والدین بیمار وجود نداشت، این حالت نشان دهنده جهش خودبخود می باشد (۲۸). در دیگر مطالعه Villard و همکارانش با استفاده از روش SSCP، توالی تمام اگزون های مربوط به دو ژن MYH7 و TNNT2 را از نظر جهش در ۹۶ بیمار فرانسوی که ۵۴ نفر دارای سابقه خانوادگی و ۴۲ نفر اسپرادیک بودند مورد بررسی قرار دادند. جهش ژن MYH7 در ۵ بیمار با سابقه خانوادگی و ۲ مورد اسپرادیک در قسمت سر و انتهای پروتئین مشاهده شد. در این مطالعه مشخص شد که بیشترین جهش در ژن MYH7 واقع شده و از طرفی شروع بیماری با تأخیر بوده است (۲۹). Garcia و همکاران، فراوانی تعدادی از ژن های سارکومری را در ۱۲۰ بیمار مبتلا به HCM در اسپانیا مورد بررسی قرار دادند. از این تعداد ۱۶ درصد سابقه خانوادگی داشتند. در این مطالعه که ۵ ژن مورد بررسی قرار گرفت، ۳۲ بیمار جهش نشان دادند که در ۱۰ مورد جهش ها مربوط به ژن MYH7 بود (۳۰).

اغلب مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته به روش SSCP بوده است. این روش با توجه به هزینه مناسب و حساسیت بالای آن که حدود ۸۵ درصد است، روشی مناسب برای بررسی جهش های احتمالی در این

ایرانی با جمعیت ها و اقوام مختلف هنوز مشخص نگردیده است. بنابراین اطلاعات محدودی در رابطه با تأثیر این ژن بر کاردیو مایوپاتی هایپرتروفی در دسترس می باشد. در این تحقیق اگزون های ۱۹-۲۳ ژن MYH7 مورد بررسی قرار گرفت. در اگزون های ۲۰، ۲۱ و ۲۳ هیچ تغییری مشاهده نشد اما نتایج نشان دهنده دو نوع تغییر نوکلئوتیدی بوده که شامل جهش C>T ۹۶۹۲ در اگزون ۱۹ و جهش G>A ۱۰۸۲۴ در اگزون ۲۲ می باشد. در جهش اول که قبلاً "توسط Anan و همکاران گزارش شده (۲۵)، کدون CGG که کد کننده آرژنین است به کدون TGG که کد کننده تربیتوفان است تبدیل می شود و در جهش دوم که قبلاً توسط Nishi و همکاران گزارش شده (۲۶)، کدون CGC که آرژنین را کد می کند به کدون CAC که کد کننده هیستیدین است تبدیل می شود. هر دو جهش R870H و R719W که از نوع جهش های بد معنی هستند باعث تغییر در ناحیه سر پروتئین میوزین می گردند.

مطالعات مختلفی در خصوص نقش جهش های MYH7 در بروز کاردیو مایوپاتی هایپرتروفی انجام شده است که از جمله این مطالعات، مطالعه ای است که توسط Liu و همکاران، با هدف غربالگری جهش های ژن های مسئول بیماری در ۱۰ شجره نامه دارای بیماران مبتلا به کاردیو مایوپاتی هایپرتروفی در جمعیت چینی انجام شده است. در این مطالعه نواحی عملکردی ژن MYH7 با PCR و تکنیک توالی یابی مستقیم غربالگری و جهش مربوط به MYH7 در ۳ شجره دیده شد، ۳ نفر از افراد این شجره ها در سنین ۴۸-۲۰ سال دچار مرگ ناگهانی در حین ورزش شده بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که جهش های MYH7 در بیماران HCM با خطر بالای مرگ ناگهانی در افراد مبتلا مرتبط می باشد (۲۷).

در مطالعه دیگری در کشور چین، از ۲ خانواده مبتلا به HCM و ۱۲۰ فرد سالم نمونه خون گرفته شد و با استفاده از PCR جهش های MYH7، MYBPC3 و TNNT2 مورد بررسی قرار گرفت. اکثر جهش های

است، اما می‌تواند تا مطالعات بیشتری بر روی سایر اگزون‌ها و تعداد نمونه‌های بیشتری انجام گیرد تا نقش اگزون‌های مختلف این ژن نیز در بیماری بیشتر مشخص شود.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از پرسنل بخش اکوکاردیوگرافی بیمارستان هاجر استان چهارمحال و بختیاری و کلیه بیماران که صمیمانه ما را در اجرای این مطالعه یاری رساندند و همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و دانشگاه شهرکرد جهت تأمین بودجه و تصویب این پایان‌نامه با شماره ثبت ۱۲۲/۶۰۰۱ در تاریخ ۸۹/۸/۵ و نیز از کلیه کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی شهرکرد کمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

ژن می‌باشد (۲۲). هر چند PCR-SSCP به عنوان یک روش معمول جهت غربالگری جهش‌ها مورد استفاده قرار گرفته است، این روش نسبتاً حساس و دقیق می‌باشد و نتایج حاصل تحت تأثیر عوامل محیطی و شرایط آزمایشگاه متغیر است (۱۹) اما در این مطالعه استفاده همزمان از روش PCR-SSCP و HA دقت بسیار بالایی را در تشخیص جهش‌های ژن MYH7 فراهم نمود و از طرفی استفاده از روش تعیین توالی برای نمونه‌های مشکوک و تأیید آنها جای هیچگونه ابهامی را خالی نگذاشت.

نتیجه‌گیری:

بر اساس نتایج این مطالعه، جهش در اگزون‌های ۱۹ تا ۲۳ ژن MYH7 نقش بسزایی در ایجاد کاردیومیوپاتی هایپرتروفی در جمعیت این استان داشته

منابع:

1. Thiene G, Corrado D, Basso C. Revisiting definition and classification of cardiomyopathies in the era of molecular medicine. Eur Heart J. 2008 Jan; 29(2): 144-6.
2. Bos JM, Ommen SR, Ackerman MJ. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: one, two, or more diseases? Curr Opin Cardiol. 2007 May; 22(3): 193-9.
3. Marian AJ, Roberts R. Recent Advances in the Molecular-Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy. Circulation. 1995 Sep; 92(5): 1336-47.
4. Arad M, Seidman JG, Seidman CE. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. Hum Mol Genet. 2002 Oct; 11(20): 2499-506.
5. Alcalai R, Seidman JG, Seidman CE. Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: From bench to the clinics. J Cardiovasc Electr. 2008 Jan; 19(1): 104-10.
6. Spirito P, Maron BJ, Bonow RO, Epstein SE. Occurrence and significance of progressive left ventricular wall thinning and relative cavity dilatation in hypertrophic cardiomyopathy. Am J Cardiol. 1987 Jul; 60(1): 123-9.
7. Lewis JF, Maron BJ. Clinical and morphologic expression of hypertrophic cardiomyopathy in patients \geq 65 years of age. Am J Cardiol. 1994 Jun; 73(15): 1105-11.
8. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. Circulation. 2003 May; 107(17): 2227-32.
9. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. Circulation. 1995 Aug; 92(4): 785-9.

10. Grothues F, Smith GC, Moon JC, Bellenger NG, Collins P, Klein HU, et al. Comparison of interstudy reproducibility of cardiovascular magnetic resonance with two-dimensional echocardiography in normal subjects and in patients with heart failure or left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol.* 2002 Jul; 90(1): 29-34.
11. Hersherberger RE, Lindenfeld J, Mestroni L, Seidman CE, Taylor MR, Towbin JA. Genetic evaluation of cardiomyopathy--a Heart Failure Society of America practice guideline. *J Card Fail.* 2009 Mar; 15(2): 83-97.
12. Frey N, Luedde M, Katus HA. Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol.* 2012 Feb; 9(2): 91-100.
13. Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell.* 1990 Sep; 62(5): 999-1006.
14. Blair E, Redwood C, de Jesus Oliveira M, Moolman-Smook J, Brink P, Corfield V, et al. Mutations of the light meromyosin domain of the β -myosin heavy chain rod in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res.* 2002; 90(3): 263-269.
15. Rai TS, Ahmad S, Ahluwalia TS, Ahuja M, Bahl A, Saikia UN, et al. Genetic and clinical profile of Indian patients of idiopathic restrictive cardiomyopathy with and without hypertrophy. *Mol Cell Biochem.* 2009 Nov; 331(1-2): 187-92.
16. Stravopodis DJ, Zappeiropoulos AZ, Voutsinas G, Margaritis LH, Papassideri IS. A PCR-based integrated protocol for the structural analysis of the 13th exon of the human beta-myosin heavy chain gene (MYH7): development of a diagnostic tool for HCM disease. *Exp Mol Pathol.* 2008 Jun; 84(3): 245-50.
17. Tajsharghi H, Thornell LE, Lindberg C, Lindvall B, Henriksson KG, Oldfors A. Myosin storage myopathy associated with a heterozygous missense mutation in MYH7. *Ann Neurol.* 2003 Oct; 54(4): 494-500.
18. Wang H, Zou YB, Song L, Wang JZ, Sun K, Song XD, et al. The genotype-phenotype correlation of the MYH7 gene c.1273G > a mutation in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Yi Chuan.* 2009 May; 31(5): 485-8.
19. Semsarian C. Guidelines for the diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Lung Circ.* 2007 Feb; 16(1): 16-8.
20. Montgomery G, Sise J: Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand J Agric Res.* 1990 May; 33(3): 437-41.
21. Sunnucks P, Wilson ACC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol.* 2000 Nov; 9(11): 1699-710.
22. Gasser RB, Hu M, Chilton NB, Campbell BE, Jex AJ, Otranto D, et al. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nat Protoc.* 2006; 1(6): 3121-8.
23. Taherzadeh-Ghahfarrokhi M, Farrokhi E, Shirmardi A, Saffari Chaleshtori J, Asadi S, Gatreh Samani K, et al. DFNBS9 gene mutations screening in non syndromic deaf subjects in Chaharmahal va Bakhtiari province. *J Shahrekord Univ Med Sci.* 2010; 11(4): 76-83.
24. Hougs L, Havndrup O, Bundgaard H, Kober L, Vuust J, Larsen LA, et al. One third of Danish hypertrophic cardiomyopathy patients with MYH7 mutations have mutations [corrected] in MYH7 rod region. *Eur J Hum Genet.* 2005 Feb; 13(2): 161-5.
25. Anan R, Greve G, Thierfelder L, Watkins H, McKenna WJ, Solomon S, et al. Prognostic Implications of Novel Beta-Cardiac Myosin Heavy-Chain Gene-Mutations That Cause Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 1994 Jan; 93(1): 280-5.

26. Nishi H, Kimura A, Harada H, Koga Y, Adachi K, Matsuyama K, et al. A Myosin Missense Mutation, Not a Null Allele, Causes Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation*. 1995 Jun; 91(12): 2911-5.
27. Liu W, Xie W, Hu D, Zhu T, Li Y, Sun Y, et al. Analysis of MYH7, MYBPC3 and TNNT2 gene mutations in 10 Chinese pedigrees with familial hypertrophic cardiomyopathy and the correlation between genotype and phenotype. *Chin J Cardiovasc Dis*. 2006 Mar; 34(3): 202-7.
28. Garcia-Castro M, Reguero JR, Batalla A, Diaz-Molina B, Gonzalez P, Alvarez V, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: low frequency of mutations in the beta-myosin heavy chain (MYH7) and cardiac troponin T (TNNT2) genes among Spanish patients. *Clin Chem*. 2003 Aug; 49(8): 1279-85.
29. Villard E, Duboscq-Bidot L, Charron P, Benaiche A, Conraads V, Sylvius N, et al. Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene. *Eur Heart J*. 2005 Apr; 26(8): 794-803.
30. Garcia-Castro M, Coto E, Reguero JR, Berrazueta JR, Alvarez V, Alonso B, et al. Mutations in sarcomeric genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol*. 2009 Jan; 62(1): 48-56.

Investigation of mutations in exons 19-23 MYH7 gene in hypertrophic cardiomyopathy patients using PCR-SSCP/HA technique in Chaharmahal va Bakhtiari province

Heydari S (MSc)¹, Khaledifar A (MD)^{2*}, Pourahmad R (PhD)³, Hashemzadeh-Chaleshtori M (PhD)³, Heydari S (MSc)⁴, Bagheri N (MSc)³, Reisi S (MSc)⁴, Abolhasani M ((MSc)³

¹Genetics Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran; ²Cardiology Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ³Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ⁴Cellular and Molecular Dept., Isfahan University, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 17/Aug/2012 Revised: 28/May/2013 Accepted: 1/June/2013

Background and aims: Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most prevalent heart disease, affecting 0.2% of the global population. HCM is also the most common cause of sudden cardiac death in individuals younger than 35 years old. Approximately 35% of affected cases are associated with exons 8-24 of MYH7 gene. The aim of this study was to investigate the possible presence of mutation in exons 19-23 MYH7 gene in patients with HCM in Chaharmahal va Bakhtiari province.

Methods: In this experimental study, 30 HCM patients referred to cardiology clinic in Shahrekord University of Medical Sciences were selected by simple sampling. DNA was extracted using standard phenol-chloroform method. Certain exons were amplified by PCR method and converted to single stranded DNAs by SSCP procedure and, along with double stranded DNAs, were electrophorized on polyacryl amid gel. Then, the suspected bands were sequenced and the results were analyzed using Chromas software.

Results: In exons 20, 21, and 23, there was no change, but two mutations including R719W and R870H, were observed in exons 19 and 22 in 2 and 1 patient, respectively.

Conclusion: Because these changes of exons 19 and 20 result in amino acid changes in beta myosin, the mutations of MYH7 gene in these exons have a significant role in patients in this province. However, it is necessary to study more patients for a better conclusion.

Keywords: Hypertrophic cardiomyopathy, MYH7 gene, Mutation, SSCP/HA.

Cite this article as: Heydari S, Khaledifar A, Pourahmad R, Hashemzadeh M, Heydari S, Bagheri N, et al. Investigation of mutations in exons 19-23 MYH7 gene in hypertrophic cardiomyopathy patients using PCR-SSCP/HA technique in Chaharmahal va Bakhtiari province. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013 Oct, Nov; 15(4): 35-44.

Corresponding author:

Cardiology Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 0989131825052, E-mail: khaledifara@yahoo.com